

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 27 February 2001 (27.02.01)	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 0817/000001
<b>International application No.</b> PCT/EP00/05862	<b>Priority date (day/month/year)</b> 09 July 1999 (09.07.99)
<b>International filing date (day/month/year)</b> 23 June 2000 (23.06.00)	
<b>Applicant</b> HERBERS, Karin et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 12 January 2001 (12.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer S. Mafla Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PA JT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BIEBERBACH, Andreas  
BASF Aktiengesellschaft  
D-67056 Ludwigshafen  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 March 2001 (12.03.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 0817/000001	
International application No. PCT/EP00/05862	International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

Name and Address MOCK, Hans-Peter Correnstrasse 3 06466 Gatersleben Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

## 3. Further observations, if necessary:

**ADDITIONAL APPLICANT/INVENTOR FOR US ONLY.**

## 4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0817/000001	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05862	International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)	Priority date (day/month/year) 09 July 1999 (09.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 15/54, 9/10, 15/31, G01N 33/53, A01H 5/00		
Applicant SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 January 2001 (12.01.01)	Date of completion of this report 08 August 2001 (08.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05862

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-27 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 1-10 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1/3-3/3 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-11 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05862

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 10

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See supplemental sheet

- ☒ the claims, or said claims Nos. 10 are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III.

**Non-establishment of opinion with regard to novelty,  
inventive step and industrial applicability**

Claim 10 relates to a test system, i.e. a product, without the product being defined in terms of its technical features. The words "based on..." and "for identifying..." do not describe features of the claimed system. A meaningful examination is therefore not possible.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	2, 3, 9	YES
	Claims	1, 4-8	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 3	YES
	Claims	9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****1. Reference is made to the following documents:**

- D1: DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE [Online]  
31 October 1996 (1996-10-31) KANEKO, T., ET AL.:  
'sequence analysis of the genome of the  
unicellular cyanobacterium Syecchocystis sp.  
PCC6803. II. sequence determination of the  
entire genome and assignment of the potential  
protein-coding regions'
- D2: HOEFGEN R ET AL: PLANT SCIENCE, Vol. 66, No. 2,  
1990, pages 221-230
- D3: WO-A-99/04622
- D4: WO-A-00/10380
- D5: WO-A-00/32757.

**2. Documents D4 and D5, which are designated P documents in the international search report, are not prior art pursuant to PCT Rule 64.1, since the claimed priority date can be acknowledged for the relevant parts of the present application.**

**3. NOVELTY**

The present application does not meet the criterion

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

stipulated in PCT Article 33(2), since the subject matter of Claims 1 and 4-8 is not novel.

The *Synechocystis* DNA sequence and polypeptide that codes therefor of the present application were already known from document D1. Although D1 does not disclose 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase activity, this is an implicit feature of the coded polypeptide. D1 therefore prejudices the novelty of Claim 1.

In Claim 5, the expression cassette is unclearly defined by the use of the vague and undefined phrase "or a DNA sequence hybridising therewith". As a result, the claim also covers, for example, the plant transformation method from document D2. That document is therefore considered to prejudice the novelty of Claims 5, 6 and 7. The phrase "with an increased content of..." in Claim 7 is not a clear, distinguishing feature, since there is no indication of a reference value and plants have a natural fluctuating amount of those substances. In addition, Claim 7 is not clearly delimited over known plants that naturally express a 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase.

Document D3 discloses the gene for tocopherol methyltransferase and the use thereof. The gene is up to 64% identical with regard to nucleic acid to SEQ ID NO:1, which means that the sequences hybridise with each other. In addition, the sequence from D3 falls under the unclear phrase "homologous to the complete sequence or to partial sequences" in Claim 4. The document therefore prejudices the novelty of Claims 4-8. It is pointed

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



out that neither Claim 4 nor Claim 5 states that the DNA codes for a 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase.

5. INVENTIVE STEP

The present application involves the isolation of the 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase gene from *Synechocystis* and the use thereof for increasing the tocopherol and tocotriene content of plants.

The enzyme 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase and the reaction catalysed thereby were known per se from the prior art (see the description, page 4, first paragraph). The cloning of a gene that codes for a known protein with known activity could be effected at the time of the priority date using generally known cloning techniques and is therefore not considered inventive. The use of such a DNA sequence for identifying inhibitors of the coded enzyme also lies within the scope of usual activity. Consequently, the subject matter of Claim 9 is not considered inventive.

In contrast, however, it is considered surprising that the expression of the DNA sequence of SEQ ID NOs:1 or 7 in plants actually leads to an increased tocopherol and tocotriene content (see the description, page 27, lines 12-16). An inventive step can therefore be acknowledged for Claims 2 and 3.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05862

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 00/10380	02 March 2000 (02.03.2000)	25 August 1999 (25.08.1999)	25 August 1998 (25.08.1998)
WO 00/32757	08 June 2000 (08.06.2000)	02 December 1999 (02.12.1999)	03 December 1998 (03.12.1998)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The prior art documents cited on pages 2 and 3 of the description are insufficiently cited, since only author and year are specified.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The application does not meet the requirements of PCT Article 6, since the claims are unclear. In Claims 3-5 and 9, DNA is defined in that it "hybridises" to the sequence from SEQ ID NOs: 1 or 7. This phrase is unclear, since, depending on the hybridisation conditions, practically any DNA can hybridise with a given DNA.

The term "homologous" in Claims 1 and 4 is also unclear. "Homology" in biology means that a common evolutionary origin exists, which cannot, however, always be determined in individual cases. In addition, Claims 1 and 4 are completely unclear as a result of their reference to DNA sequences that are homologous "to partial sequences".

Since independent Claims 1-5 and 9 insufficiently define the DNA sequence, they do not meet the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which each independent claim must contain all the technical features that are essential to the definition of the invention. The present application discloses simply the cloning of 2-methyl-6-phytyl-hydroquinone-methyltransferase from *Synechocystis* and therefore this should be clearly defined in the claims.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>0817/000001</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/ 05862</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/06/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>09/07/1999</b>
Anmelder <b>SUNGENE GMBH &amp; CO. KGAA</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**IDENTIFIZIERUNG UND UEBEREXPRESSION EINER DNA-SEQUENZ KODIEREND FUER EINE 2-METHYL-6-PHYTYLHYDROCHINON-METHYLTRANSFERASE IN PFLANZEN**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/31 G01N33/53  
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 31. Oktober 1996 (1996-10-31) KANEKO, T., ET AL. : "sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Syecchocystis sp. PCC6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of the potential protein-coding regions" XP002152668 accession no. D90914</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN.

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOEFGEN R ET AL: "BIOCHEMICAL AND GENETIC ANALYSIS OF DIFFERENT PATATIN ISOFORMS EXPRESSED IN VARIOUS ORGANS OF POTATO SOLANUM-TUBEROSUM" PLANT SCIENCE (LIMERICK), Bd. 66, Nr. 2, 1990, Seiten 221-230, XP000964790 ISSN: 0168-9452 in der Anmeldung erwähnt Seite 223, linke Spalte ---	5,6
A	WO 99 04622 A (UNIV NEVADA) 4. Februar 1999 (1999-02-04) in der Anmeldung erwähnt ---	
P,X	WO 00 10380 A (UNIV NEVADA) 2. März 2000 (2000-03-02) das ganze Dokument ---	1-8
P,X	WO 00 32757 A (RAFALSKI J ANTONI ;DU PONT (US); COUGHLAN SEAN J (US); MIAO GUO HU) 8. Juni 2000 (2000-06-08) das ganze Dokument -----	9,10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05862

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9904622	A	04-02-1999	AU	8506198 A	16-02-1999
			EP	1009812 A	21-06-2000
WO 0010380	A	02-03-2000	AU	5786199 A	14-03-2000
WO 0032757	A	08-06-2000	AU	2037700 A	19-06-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

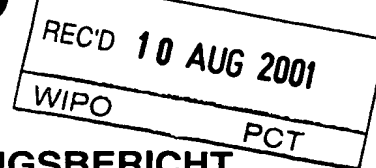


# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0817/000001	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05862	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  12/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  08.08.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Giebeler, K  Tel. Nr. +49 89 2399 8546 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlag des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-27                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-10                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/3-3/3                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-11, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 10.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 10 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):  
**siehe Beiblatt**
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 10 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	2,3,9
	Nein: Ansprüche	1,4-8
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	2,3
	Nein: Ansprüche	9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

**1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

und / oder

**2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Anspruch 10 bezieht sich auf ein Testsystem, also ein Erzeugnis, ohne das dieses Erzeugnis durch seine technischen Merkmale definiert wird. Die Ausdrücke "basierend auf..." und "zur Identifizierung..." beschreiben keine Merkmale des beanspruchten Systems. Es ist daher keine sinnvolle Prüfung möglich.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE [Online] 31. Oktober 1996 (1996-10-31) KANEKO, T., ET AL. : 'sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Syecchocystis sp. PCC6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of the potential protein-coding regions'
- D2: HOEFGEN R ET AL: PLANT SCIENCE, Bd. 66, Nr. 2, 1990, Seiten 221-230
- D3: WO 99 04622 A
- D4: WO 00 10380 A
- D5: WO 00 32757 A

3. Die im Internationalen Recherchenbericht als P-Dokumente bezeichnete Dokumente D4 und D5 sind nicht als Stand der Technik nach Regel 64(1) PCT zu berücksichtigen, da der beanspruchte Prioritätstag den relevanten Teilen der vorliegenden Anmeldung zuerkannt werden kann.

4. **NEUHEIT**

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 und 4-8 nicht neu ist.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Die DNA-Sequenz und das dadurch kodierte Polypeptid der vorliegenden Anmeldung aus *Synechocystis* waren bereits aus dem Dokument D1 bekannt. Zwar offenbart D1 nicht die 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase-Aktivität, diese ist jedoch ein implizites Merkmal des kodierten Polypeptids. Daher ist D1 neuheitsschädlich für den Anspruch 1.

In Anspruch 5 wird die Expressionskassette durch Verwendung des vagen und unbestimmten Ausdruck "oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz" unklar definiert. Dadurch umfaßt der Anspruch beispielsweise auch die Verfahren zur Pflanzen-Transformation aus dem Dokument D2. Diese Dokument wird daher als neuheitsschädlich für die Ansprüche 5, 6 und 7 angesehen. Der Begriff "mit erhöhtem Gehalt an ..." in Anspruch 7 stellt kein klares, unterscheidendes Merkmal dar, weil kein Referenzwert angegeben wird und Pflanzen eine natürlichen Schwankungsbreite an diesen Stoffen aufweisen. Anspruch 7 ist außerdem nicht klar gegen bekannte Pflanzen abgegrenzt, welche natürlicherweise eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase exprimieren.

Das Dokument D3 offenbart das Gen für die Tocopherol-Methyltransferase und seine Verwendung. Das Gen weist bis zu 64% Nukleinsäure-Identität zu SEQ ID NO:1 auf, was bedeutet, daß die Sequenzen miteinander hybridisieren. Außerdem fällt die Sequenz aus D3 unter den unklaren Begriff "zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homolog" in Anspruch 4. Das Dokument ist daher neuheitsschädlich für die Ansprüche 4-8. Es sei angemerkt, daß weder in Anspruch 4 noch in Anspruch 5 gesagt wird, daß die DNA für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase kodiert.

## 5. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Die vorliegende Anmeldung beruht auf der Isolierung des 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase-Gens aus *Synechocystis* und dessen Verwendung zur Erhöhung des Gehalts an Tocopherolen und Tocotrien in Pflanzen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Das Enzym 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase und die von ihm katalysierte Reaktion waren aus dem Stand der Technik an sich bekannt (siehe Beschreibung, Seite 4, Absatz 1). Die Klonierung eines Gens, welches für ein bekanntes Protein mit bekannter Aktivität kodiert, war am Prioritätstag durch Anwendung allgemein bekannter Klonierungstechniken zu bewerkstelligen und wird folglich nicht als erfinderisch angesehen. Die Verwendung einer solchen DNA-Sequenz zur Identifizierung von Inhibitoren des kodierten Enzyms liegt ebenfalls im Rahmen allgemeinen fachlichen Handelns. Daher wird der Gegenstand des Anspruchs 9 nicht als erfinderisch angesehen.

Demgegenüber wird jedoch als überraschend gewertet, daß die Expression der DNA-Sequenz der SEQ ID NO:1 oder 7 in Pflanzen tatsächlich zu einem erhöhten Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienen führte (siehe Beschreibung, Seite 27, Zeilen 12-16). Folglich kann für die Ansprüche 2 und 3 eine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

### **Zu Punkt VI**

#### **Bestimmte angeführte Unterlagen**

##### **6. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 00/10380	02.03.00	25.08.99	25.08.98
WO 00/32757	08.06.00	02.12.99	03.12.98

### **Zu Punkt VII**

#### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

7. Die auf den Seiten 2 und 3 der Beschreibung angegebene Dokumente aus dem Stand der Technik werden unzureichend zitiert, da lediglich Autor und Jahr angegeben werden.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Zu Punkt VIII**

**B stimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

8. Die Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT, weil die Ansprüche nicht klar sind. In den Ansprüchen 3-5 und 9 wird DNA dadurch definiert, daß sie zu der Sequenz aus SEQ ID NO:1 oder 7 "hybridisiert". Dieser Begriff ist dadurch unklar, daß je nach Hybridisierungsbedingungen praktisch jede beliebige DNA mit einer gegebenen DNA hybridisieren kann. Der in den Ansprüchen 1 und 4 verwendete Begriff "homolog" ist ebenfalls unklar. "Homologie" hat in der Biologie die Bedeutung, daß ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung besteht, was aber im Einzelfall nicht immer feststellbar ist. Völlig unklar sind die Ansprüche 1 und 4 außerdem durch ihren Bezug zu DNA-Sequenzen, welche "zu Teilsequenzen" homolog sind.

Da die unabhängigen Ansprüche 1-5 und 9 die DNA-Sequenz unzureichend definieren, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind. Die vorliegende Anmeldung offenbart lediglich die Klonierung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis*, und diese sollte folglich in den Ansprüchen klar definiert werden.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/04330 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
15/54, 9/10, 15/31, G01N 33/53, A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05862

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Juni 2000 (23.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 31 834.4 9. Juli 1999 (09.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE];  
D-06468 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERBERS, Karin  
[DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).  
BADUR, Ralf [DE/DE]; Petersilienstrasse 17, D-38640  
Goslar (DE). KUNZE, Irene [DE/DE]; Mühlenweg 11,  
D-06466 Gatersleben (DE). GEIGER, Michael [DE/DE];  
Neuer Weg 15, D-06484 Quedlinburg (DE). \*

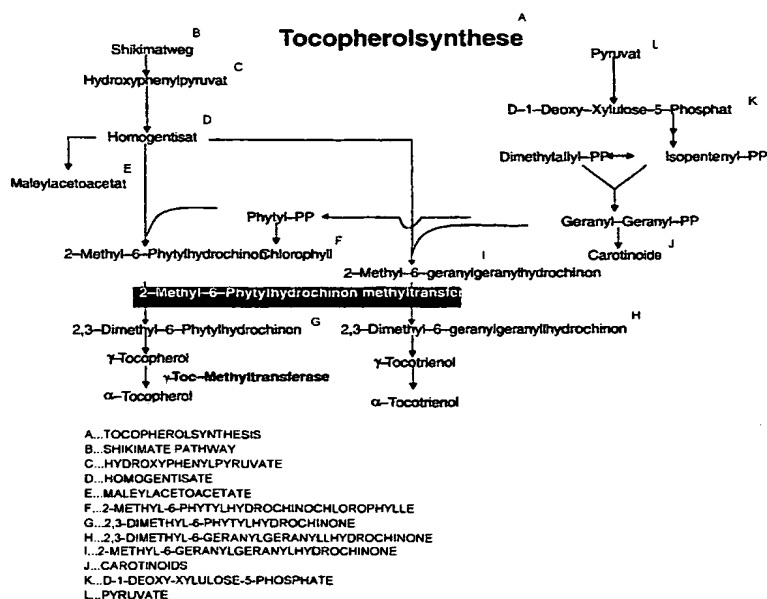
(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas: BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IDENTIFICATION AND OVEREXPRESSION OF A DNA SEQUENCE CODING FOR 2-METHYL-6-PHYTYLHYDROQUINONE-METHYLTRANSFERASE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG UND ÜBEREXPRESSION EINER DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 2-METHYL-6-PHYTYLHYDROCHINON-METHYLTRANSFERASE IN PFLANZEN



(57) Abstract: A method for the production of plants with an increased tocopherol and tocotrienol content by overexpression of a gene coding for 2-methyl-6-phytylhydroquinone-methyltransferase.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen durch Überexpression eines Gens codierend für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase.

WO 01/04330 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Identifizierung und Überexpression einer DNA-Sequenz codierend für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase in Pflanzen

5

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend für ein Polypeptid mit 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase Aktivität. Zudem

10 betrifft die Erfindung die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-Methyltransferase Aktivität zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen, speziell die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder mit dieser hybri-

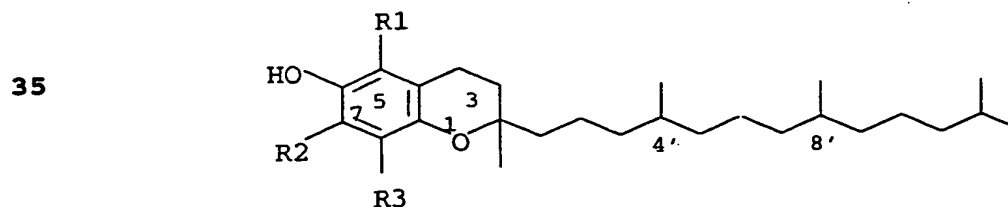
15 disierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

20 Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol- und Tocotrienolgehal-

25 tes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesell-

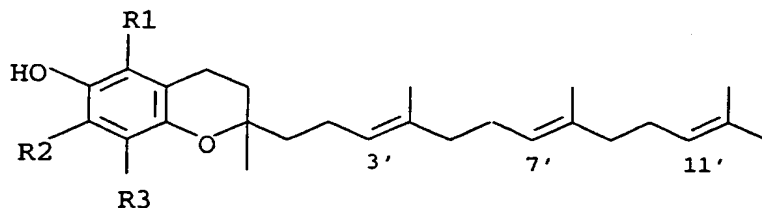
30 schaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a- d):



- 40 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
 1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
 1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

45

5



2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

10 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

15 Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen durch klassische Züchtungsmethoden sind Grenzen gesetzt.

Eine sinnvolle Alternative ist das gentechnische Vorgehen,

20 beispielsweise die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert  
25 werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus  $\text{C}_5$ -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.

30 Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophylle, Tocopherole und Vitamin K) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

35 Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit ( $\text{C}_5$ ), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch *in vivo* Fütterungsexperimente mit  $\text{C}^{13}$  gezeigt, daß in verschiedenen

40 Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschrieben wird. Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten

45 "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Lange et al, 1998; Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997; Lichtenthaler et al, 1997; Sprenger et

al, 1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und im weiteren zu IPP umgesetzt (Arigoni et al, 1997; Zeidler et al, 1998). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach & Lichtenthaler, 1993). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al, 1997; Arigoni et al, 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C10) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C15) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C20) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C40-Vorläufer für Carotinoide.

Bei gemischten Prenyllipiden ist die Isopren-Seitenkette verschiedener Länge mit Nicht-Isopren Ringen verbunden wie beispielsweise ein Porphyrin-Ring bei Chlorophyll a und b. Die Chlorophylle und Phylloquinone enthalten eine C20 Phytyl-Kette, in der nur die erste Isopren-Einheit eine Doppelbindung enthält. GGPP wird durch die Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase (GGPPOR) zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Das Chorismat wird ausgehend von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) durch deren Kondensation zu 3-deoxy-D-Arabino-heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) über die Zwischenstufen des Shikimatweges 3'-Dehydroquinat, 3'-Dehydroshikimat, Shikimat, Shikimat-3-Phosphat und 5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat gebildet. Dabei wird das Erythrose-4-Phosphat vom Calvinzyklus gebildet und das PEP von der Glykolyse bereitgestellt. Die oben beschriebene Homogentisinsäure wird anschließend an Phytylpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol, das 2-Methyl-6-phytylhydrochinon bzw. das

2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinon zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\alpha$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996)).

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol- bzw. Tocotrienolgehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD). WO 99/04622 beschreibt eine Gensequenz codierend für eine  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase aus einem photosynthetisch aktiven Organismus. WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherolbiosynthese zur Folge hat.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase Gens in Pflanzen.

Zu diesem Zweck wurde in transgenen Pflanzen die Aktivität der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase (MPMT) durch Überexpression des MPMT-Gens aus Synechocystis spec. PCC 6803 er-

hört. Dies kann prinzipiell durch Expression homologer oder heterologer MPMT-Gene erreicht werden.

In Beispiel 2 wird erstmals die Klonierung einer MPMT-DNA-Sequenz (SEQ-ID Nr. 1) aus *Synechocystis spec. PCC 6803* beschrieben. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten wird der MPMT-Nukleotidsequenz aus *Synechocystis* eine Transitsignalsequenz (Abb. 3, Abb. 4) vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein MPMT-Gen codiert, das mit SEQ-ID Nr. 1 hybridisiert, bzw. zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homolog ist und das aus anderen Organismen bzw. aus Pflanzen stammt.

Das durch die zusätzliche Expression des MPMT-Gens nun vermehrt zur Verfügung stehende 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon wird weiter in Richtung Tocopherole und Tocotrienol umgesetzt (Abbildung 1).

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das MPMT-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen wurden *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum* eingesetzt.

Messungen an MPMT-*Synechocystis* knock out Mutanten ergaben bezüglich des Gehaltes an Tocopherolen und Tocotrienolen eine drastische Abnahme. Dies belegt den direkten Einfluß der plastidären pflanzlichen MPMT auf die Synthese von Tocopherolen und Tocotrienolen.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 aus *Synechocystis spec. PCC 6803*, die für eine MPMT oder deren funktionelle Äquivalente kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine MPMT kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherolen und Tocotrienolen verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden ko-

dierenden Sequenz für das MPMT-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) eingebaut werden. Abbildung 4 zeigt ein Derivat des Transformationsvektors pBin -19 mit samenspezifischem Legumin B4-Promotor.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen MPMT-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstu-



fen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 5 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 10 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und 15 Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten MPMT-DNA Sequenz 20 und vorzugsweise einer zwischen Promotor und MPMT-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: 25 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. 30 and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

35 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein MPMT-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des MPMT-Gens in 40 die Chloroplasten vom MPMT-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Nicotiana tabacum Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist. 45

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

5

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
10 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

15

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGTGC  
20 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
25 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGG  
ATCC\_BamHI

30 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine MPMT kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen MPMT-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

45

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 5 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze 10 sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein MPMT-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

15 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten 20 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

25 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids 30 pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein MPMT-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, 35 kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder 40 Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von 45 S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden,

die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines MPMT-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine MPMT kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen und Tocotrienolen der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen und Tocotrienolen eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion

und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein MPMT-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine MPMT kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der MPMT-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Beispiel 8 beschreibt einen Deletionsklon des MPMT-Gens, siehe SEQ-ID Nr. 7)

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression eines MPMT-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche
- 5 artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die MPMT-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die
- 10 Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 15 Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein MPMT-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer
- 20 Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf MPMT-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Transitpeptid, das das MPMT-Protein in die Plastiden leitet.
- 25 Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen und Tocotrienolen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression eines MPMT-Gens SEQ-ID Nr. 1
- 30 oder SEQ-ID Nr. 7 in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- Dabei kann sowohl der Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen
- 35 gesteigert werden. Vorzugsweise wird der Gehalt an Tocopherolen gesteigert. Aber es ist auch möglich unter bestimmten Bedingungen vorzugsweise den Gehalt an Tocotrienolen zu steigern.
- Der Biosyntheseort von Tocopherolen beispielsweise ist unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des MPMT-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen MPMT-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten MPMT-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des MPMT-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen gete-
- 10 stet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder eine mit dieser hybridisierende bzw. zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-
- 15 Sequenz, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf,
- 20 Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Tagetes, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin photosynthetisch aktive Organismen transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder eine mit dieser hybridisierende bzw. zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz. Photosynthetisch aktive Organismen sind ne-
- 30 ben Pflanzen, beispielsweise Cyanobakterien, Moose und Algen.

- Da es sich bei diesem Biosyntheseweg um einen ausschließlich plastidär-lokalisierten Stoffwechselweg handelt, bietet er optimale Targetenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren. Da sich nach
- 35 heutigem Stand der Technik kein mit der *Synechocystis* MPMT identisches oder ähnliches Enzym in humanen und tierischen Organismen befindet, ist davon auszugehen, daß Inhibitoren sehr spezifisch auf Pflanzen wirken sollten.

- 40 Wie bereits erwähnt ist die MPMT ein potentielles Target für Herbizide. Um effiziente Hemmstoffe der MPMT finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz
- 45 der MPMT aus *Synechocystis* in einen Expressionsvektor (pQE, Qia-gen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert.

Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte MPMT-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die MPMT spezifischen Hemmstoffen.

- 5 Dazu kann die MPMT beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der MPMT in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden
- 10 Wirkstoffes machen.

- Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es,
- 15 reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

- Durch Überexpression der für eine MPMT kodierenden Gensequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 in einer Pflanze wird eine erhöhte
- 25 Resistenz gegenüber Inhibitoren der MPMT erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- Das unter Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID
- 30 Nr. 7 hergestellte MPMT-Protein eignet sich auch zur Durchführung von Biotransformationen zur Bereitstellung größerer Mengen 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon. Dabei wird 2-Methyl-6-phytylhydrochinon in Gegenwart des Enzyms MPMT und des Cosubstrats S-Adenosyl-L-Methionin zu 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon umgesetzt.
- 35 Die Biotransformation läßt sich prinzipiell mit ganzen Zellen, die das Enzym MPMT exprimieren oder Zellextrakten aus diesen Zellen oder aber mit aufgereinigter oder hochreiner MPMT in Gegenwart von S-Adenosyl-L-Methionin durchführen.

- 40 Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder eine mit dieser
- 45 hybridisierende, bzw. zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle oder Protoplasten



von Pflanzen einbringt und diese zu ganzen Pflanzen regeneriert.

- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7
- 5 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen durch Expression einer MPMT DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 10 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 15 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

#### 20 Beispiel 1

Identifizierung einer 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803.

- 25 Die Klonierung und Identifizierung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 erfolgte folgendermaßen:

- Unter Verwendung eines in S-Adenosyl-L-Methionin Methyltransferasen konservierten Sequenzmotivs, welches für die Bindung des S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) verantwortlich ist (C.P. Joshi und V.L. Chiang. PMB. 37: 663-374, 1998), wurde eine genomische DNA Datenbank von *Synechocystis spec.* PCC 6803 durchmustert (Kaneko et al., DNA Res. 34:109-136, 1996). Die bei der Durchmusterung
- 35 identifizierten hypothetischen Proteine, welche über das SAM-Bindemotiv verfügten, wurden mit den Primärsequenzen der *Synechocystis spec.* PCC 6803  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase (bezeichnet als slr0089) sowie der *Arabidopsis thaliana*  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase (David Shintani und Dean DellaPenna. Science.
- 40 282:2098-2100, 1998) verglichen.

- Dabei konnte ein hypothetisches Protein identifiziert werden (bezeichnet sl10418 SEQ.-ID Nr. 2), welches geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit den  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferasen
- 45 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana* aufwies (36% bzw. 28% Identität).

- Weitere Untersuchungen der Primärsequenz des hypothetischen Proteins sll0418 belegten das Vorkommen einer putativen prokaryontischen Signalsequenz innerhalb der ersten 20 Aminosäuren (PSIGNAL, PC/GENE™ IntelliGenetics, Inc ©1991). Eine solche Sequenz konnte
- 5 ebenfalls in der *Synechocystis spec. PCC 6803*  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase (slr0089) identifiziert werden (D. Shintani und D. DellaPenna. *Science*. 282:2098-2100,1998) und deutet auf eine identische Lokalisation der beiden Proteine hin.
- 10 Das vorhergesagte Molekulargewicht des unprozessierten Proteins beträgt 34,9 kDa und liegt damit in einem Bereich der auch für die *Synechocystis spec. PCC 6803*  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase (David Shintani und Dean DellaPenna, *Science*. 282:2098-2100,1998) und der aus Paprikafrüchten gereinigten  $\gamma$ -Tocopherolmethyltrans-
- 15 ferase (d'Harlingue and Camara, *Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis: Purification of  $\gamma$ -Tocopherol Methyltransferase from Capsicum Chromoplasts. Journal of Biological Chemistry, Vol. 269 No.28, 15200-152003,1985)* ermittelt wurde.
- 20 Unter Berücksichtigung der Fakten, schlußfolgerten wir, daß es sich bei dem hypothetischen Protein sll0418 um eine Tocopherolmethyltransferase handeln könnte.

#### Beispiel 2

25

Amplifikation und Klonierung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC 6803*

- Die DNA kodierend für den ORF (open reading frame) sll0418 wurde
- 30 mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis spec. PCC 6803* gemäß der Methode nach Crispin A. Howitt (*BioTechniques* 21:32-34, July 1996) unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (sll04185' Seq. Nr. 5) und eines antisense spezifischen Primers (sll04183' Seq. Nr. 6) amplifiziert.

35

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

40

- 5 $\mu$ l einer *Synechocystis spec. PCC 6803* Zellsuspension
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 $\mu$ g Rinderserum-Albumin

45

- 40pmol sll04185'
- 40pmol sll04183'
- 15 $\mu$ l 3,3 $\times$  rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)

-5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

5 Schritt 3: 2 Minuten 58°C (Annealing)

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

40 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Schritt 6: 4°C (Warteschleife)

10

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers bestätigt.

15

Beispiel 3

Erzeugung einer sll0418 Knock out Mutante

20 Ein DNA Konstrukt zur Erzeugung einer Deletionsmutante des ORF sll0418 in *Synechocystis spec.* PCC 6803 wurde unter Anwendung von Standard Klonierungstechniken erzeugt.

Der Vektor pGEM-T/sll0418 wurde unter Verwendung des Restrikti-

25 onsenzyms BallI verdaut. Das Vorhandensein von zwei BallI Schnittstellen innerhalb der sll0418 Sequenz (Position Bp 109 bzw Bp 202) hatte den Verlust eines 93 Bp umfassenden internen Fragmentes zur Folge. In die BallI Schnittstellen des sll0418 ORF wurde die Aminoglycosid-3'Phosphotransferase des Transposons Tn903 klo-

30 niert. Dazu wurde das Tn903 als EcoRI Fragment aus dem Vektor pUC4k (Vieira, J und Messing, J Gene:19, 259-268, 1982) isoliert, die überstehenden Enden des Restriktionsverdaus nach Standardmethoden in glatte Enden überführt und in den BallI geschnittenen Vektor pGEM-T/sll0418 ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur

35 Transformation von *E.coli* Xll blue Zellen verwendet. Transformanden wurden durch Verwendung von Kanamycin und Ampicillin selektioniert. Ein rekombinantes Plasmid (pGEM-T/sll0418::tn903) wurde isoliert und zur Transformation von *Synechocystis spec.* PCC 6803 gemäß der Methode nach Williams (Methods Enzymol. 167:776-778, 40 1987) eingesetzt.

*Synechocystis spec.* PCC 6803 Transformanden wurden selektioniert auf Kanamycin haltigem (kan) BG-11 Festmedium (Castenholz, Methods in Enzymology, Seite 68-93, 1988) bei 28°C und 30µmol

45 Photonen  $\times (m^2 \times s)^{-1}$ . Vier unabhängige Knock out Mutanten konnten

nach fünf Selektionsrunden (Passagen von Einzelkolonien auf frisches BG-11kn Medium) erzeugt werden.

Der vollständige Verlust des sll0418 Endogens bzw. der Austausch  
5 gegen die rekombinante sll0418::tn903 DNA, wurde durch PCR Analysen bestätigt.

#### Beispiel 4

10 Vergleich der Tocopherolproduktion in *Synechocystis spec.* PCC 6803 Wildtypzellen und den erzeugten Knock out Mutanten des ORF sll0418.

Die auf den BG-11kan Agarmedium kultivierten Zellen der vier un-  
15 abhängigen *Synechocystis spec.* PCC 6803 Knock out Mutanten des ORF sll0418 sowie untransformierte Wildtypzellen wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Diese Kulturen wurden bei 28°C und 30µmol Photonen  $\times (m^2 \times s)^{-1}$  (30µE) für ca. 3 Tage kultiviert. Nach Bestimmung der OD<sub>730</sub> der einzelnen Kulturen, wurde die  
20 OD<sub>730</sub> aller Kulturen durch entsprechende Verdünnungen mit BG-11 (Wildtypen) bzw. BG-11kan (Mutanten) synchronisiert. Diese auf Zelldichte synchronisierten Kulturen wurden zum Animpfen von drei Kulturen pro Mutante bzw. der Wildtypkontrollen verwendet. Die biochemischen Analysen konnten somit unter Verwendung von jeweils  
25 drei unabhängig gewachsenen Kulturen einer Mutante und der entsprechenden Wildtypen durchgeführt werden. Die Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>730</sub>=0,3 angezogen. Das Medium der Zellkultur wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge entfernt. Der daran  
30 anschließende Aufschluß der Zellen erfolgte durch viermalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 30°C, 1000rpm in 100% Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden. Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

35 Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer Waters Alliance 2690 HPLC-Anlage analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule( ProntoSil 200-3-C30, Bischoff) mit einer mo-  
40 bilen Phase von 100% Methanol getrennt und anhand von Standards (Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295nm, Emmision 320 nm), die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

In den *Synechocystis spec.* PCC 6803 knock out Mutanten des ORF sll0418 konnten keine Tocopherole und Tocotrienole gefunden werden. Tocopherole und Tocotrienole wurden jedoch in den *Synechocystis spec.* PCC 6803 Wildtypzellen gemessen.

5

Der Verlust der Fähigkeit zur Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen innerhalb der knock out Mutanten des ORF sll0418 im Vergleich zu den *Synechocystis spec.* PCC 6803 Wildtypzellen zeigt, daß das Gen sll0418 für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-

10 methyltransferase kodiert.

Beispiel 5

Funktionelle Charakterisierung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-  
15 methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 durch heterologe Expression in *E.coli*.

Das hypothetische Protein sll0418 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 konnte durch funktionelle Expression in *E.coli* als  
20 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase identifiziert werden.

Das aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 amplifizierte Gen sll0418 wurde im korrekten Leserahmen in den Expressionsvektor pQE-30  
25 (Qiagen) subkloniert. Die zur Amplifikation des ORF sll0418 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 verwendeten Primer sll04185' bzw. sll04183' (Sequenz ID Nr. 5 und 6) waren so konstruiert, daß an das 5' Ende und das 3' Ende des Amplikons BamHI Restriktions-  
schnittstellen addiert wurden, siehe Sequenz ID Nr. 3. Das  
30 sll0418 Fragment wurde unter Verwendung dieser flankierenden BamHI Restriktionschnittstellen aus dem rekombinanten Plasmid pGEM-T/sll0418 isoliert und unter Anwendung von Standardmethoden in einen BamHI geschnittenen pQE-30 ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von M15 *E.coli* Zellen verwendet und  
35 Kanamycin und Ampicillin resistente Transformanten wurden analysiert. Die Kanamycin Resistenz wird durch das in den M15 Zellen enthaltene pREP-4 Plasmid vermittelt. Ein rekombinantes Plasmid (pQE-30/sll0418) welches das sll0418 Fragment in der richtigen Orientierung trug, wurde isoliert. Die Identität und Orientie-  
40 rung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Das rekombinante Plasmid pQE-30/sll0418 wurde zur Transformation von M15 *E.coli* Zellen verwendet, um rekombinantes sll0418 Protein zu erzeugen. Unter Verwendung einer aus der Transformation  
45 hervorgegangenen Kolonie wurde eine Übernachtskultur in Luria Broth Medium mit 200µg/ml Ampicillin (Amp) und 50µg/ml Kanamycin (Kan) angeimpft. Ausgehend von dieser Kultur wurde am nächsten

Morgen eine 100ml Luria Broth Kultur (Amp/Kan) angeimpft. Diese Kultur wurde bei 28°C auf einem Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub>:0,35-0,4 inkubiert. Anschließend wurde die Produktion des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,4 mM Iso-  
5 propyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Kultur wurde für weitere 3 Stunden bei 28°C geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 8000g pelletiert.

Das Pellet wurde in 600µl Lysispuffer (ca. 1-1,5 ml /g Pellet  
10 Naßgewicht, 10 mM HEPES KOH pH 7,8, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,24 M Sorbitol ) resuspendiert. Anschließend wurde PMSF ( Phenylmethylsulfonat ) zu einer Endkonzentration von 0,15 mM beige-  
fügt und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der Auf-  
schluß der Zellen erfolgte durch einen 10 Sekunden Ultraschall-  
15 Puls unter Verwendung eines Ultraschallstabes. Nach Zugabe von Triton X100 (Endkonzentration 0,1%) wurde die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 30 Minuten bei 25000xg abzentrifugiert und der Überstand zum Assay eingesetzt.

20

Die Aktivitätsbestimmung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase erfolgt durch Nachweis des radioaktiv markierten Reaktionsproduktes 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon.

25 Dazu wurden 135µl des Enzyms (ca.300-600µg) zusammen mit 20µl Substrat (2-Methyl-6-phytylhydrochinon) und 15µl (0,46 mM SAM <sup>14</sup>C) Methylgruppendonator in folgendem Reaktionspuffer : 200µl (125mM) Tricine-NaOH pH 7,6, 100µl (1,25 mM) Sorbitol, 10µl (50mM) MgCl<sub>2</sub> und 20µl (250mM) Ascorbat für 4 Stunden bei 25°C im Dunkeln  
30 inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 750µl Chloroform/Methanol (1:2) + 150µl 0,9% NaCl. Der gemischte Ansatz wurde kurz zentrifugiert und die obere Phase wurde verworfen. Die  
35 untere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unter Stickstoff eingedampft. Die Rückstände wurden in 20µl Ether aufgenommen und auf eine Dünnschicht-Platte zur chromatographischen Trennung der Substanzen aufgetragen (feste Phase: HPTLC-Platten: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merk), flüssige Phase: Toluol). Der Nachweis  
40 des radioaktiv markierten Reaktionsproduktes erfolgt durch Verwendung eines Phosphorimagers.

Diese Experimente bestätigten, daß es sich bei dem durch das Gen sl10418 (SEQ-ID Nr.1) aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 kodierte  
45 Protein um eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase handelt, da es die enzymatische Aktivität zur Umwandlung von

2-Methyl-6-phytylhydrochinon in 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon besitzt.

Abbildung 2 zeigt einen Sequenzvergleich auf Aminosäureebene zwischen den  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferasen aus *Synechocystis spec.* PCC *Synechocystis spec.* PCC 6803 (slr0089) und *A. thaliana* (aratmt) mit der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase (sl104189) aus *Synechocystis spec.* PCC 6803. Die Übereinstimmung mit den  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferasen aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 und *Arabisopsis thaliana* beträgt 36 bzw. 28 % Identität.

#### Beispiel 6

Substratspezifität der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase

Enzymatische Untersuchungen wie in Beispiel 5 durchgeführt belegen, daß das Enzym MPMT - kodiert durch das Gen sl10418 (SEQ-ID Nr. 1) aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 - 2-Methyl-6-phytylhydrochinon in 2,3-Dimethyl-6-phytylhydrochinon umwandelt.

Zusätzlich besitzt das Enzym MPMT eine 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinon-methyltransferase Aktivität, wohingegen eine  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase Aktivität nicht nachgewiesen werden konnte. Somit ist belegt, daß das Enzym 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase an der Biosynthese der Tocotrienole beteiligt ist, da es 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinon zu 2,3-Dimethyl-6-geranylgeranylhydrochinon umwandelt. Dies zeigt deutlich die Verschiedenheit der Enzymaktivität der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase im Vergleich zur  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase.

#### Beispiel 7

Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das MPMT-Gen

Transgene Pflanzen wurden erzeugt, die die 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC6803 zum einen unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980) und zum anderen unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors des Legumin Gens aus *Vicia faba* (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6): 2707-2720, 1986) exprimieren. Die Grundlage der konstitutiven Expression der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 erzeugten Plasmides war der pBinAR-TkTp-9 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen

und Willmitzer, Plant Sci. 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980), das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) sowie die für das Transitpeptid  
5 der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase kodierende DNA Sequenz (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC6803 in diesen Vektor, erzeugt eine  
10 Translationsfusion der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase mit dem plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein Transport des Transgens in die Plastiden.

Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das Gen *sll0418* unter  
15 Verwendung der flankierenden BamHI Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pGEM-T/*sll0418* isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen BamHI geschnittenen pBinAR-TkTp-9 ligiert (siehe Abbildung 3). Dieses Plasmid (pBinAR-TkTp-9/*sll0418*) wurde zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum* verwendet. Fragment A  
20 (529 bp) in Abbildung 3 beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (245bp) kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* Transketolase, Fragment C (977Bp) kodiert ORF *sll0418* aus *Synechocystis spec.* PCC 6803, Fragment D (219Bp) kodiert für das  
25 Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Zur Erzeugung eines Plasmides, welches die samenspezifische Expression der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus  
30 *Synechocystis spec.* PCC 6803 in Pflanzen ermöglicht, wurde der samenspezifische Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986) verwendet. Aus dem Plasmid pCR-Script/lePOCS wurde das 2,7 Kb Fragment des Legumin B4 Gen Promotors unter Verwendung der den Promotor 5' flankierenden  
35 EcoRI und der 3' flankierenden KpnI Schnittstellen isoliert. Das Plasmid pBinAR-TkTp-9/*sll0418* wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI behandelt. Dies hatte zur Folge, daß der 35S-Promotor des CaMV aus diesem Plasmid herausgetrennt wurde. Der Promotor des Legumin Gens wurde anschließend als  
40 EcoRI/KpnI Fragment in diesen Vektor kloniert, wodurch ein Plasmid erzeugt wurde, welches die Expression des Gen *sll0418* unter die Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors stellte, siehe Abbildung 4. Dieses Plasmid (pBinARleP-TkTp-9/*sll0418*) wurde zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana*, *Brassica*  
45 *napus* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen verwendet.



Fragment A (2700 bp) in Abbildung 4 beinhaltet den Promotor des Legumin B4 Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (245bp) kodiert für das Transitpeptid der *Nicotina tabacum* Transketolase, Fragment C (977Bp) kodiert für das ORF sll0418 aus *Synechocystis spec. PCC 6803*, Fragment D (219Bp) für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

#### Beispiel 8

#### 10 Herstellung von Expressionskassetten enthaltend einen Deletionsklon des MPMT-Gens

Auf Grundlage einer Computeranalyse wurde in der Primärsequenz des ORF sll0418 ein putatives prokaryontisches Sekretionssignal

15 identifiziert. Um sicherzustellen, daß dieses bei der Expression in Pflanzen keinen negativen Einfluß auf den Import des Proteins in die Plastiden nimmt, wurde ein Derivat der Sequenz des sll0418 erzeugt, bei dem das putative Sekretionssignal deletiert wurde (Sequenz-ID Nr. 7). Diese Deletion wurde unter Anwendung der PCR

20 Technologie durchgeführt. Durch die dabei verwendeten Primer (sll0418Dsp5', Sequenz-ID Nr. 9 und sll0418Dsp3', Sequenz-ID Nr. 10) wurde an das 5'Ende der Sequenz eine EcoRV Restriktionsschnittstelle und an das 3'Ende eine SalI Restriktionsschnittstelle addiert, durch die eine gerichtete Klonierung in den Vek-

25 tor pBinAR-TkTp-9 ermöglicht wurde. Das entstandene Plasmid pBinAR-TkTp-9/sll0418ASP ist in Abbildung 5 beschrieben. Fragment A (529 bp) in Abbildung 5 beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (245bp) Fragment kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana*

30 *tabacum* Transketolase, Fragment C (930Bp) ORF sll0418ASP aus *Synechocystis spec. PCC 6803* Fragment D (219Bp) für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Zur Erzeugung eines Plasmides, welches die samenspezifische Ex-

35 pression des Deletionsklons der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC6803* in Pflanzen ermöglicht, wurde ebenfalls der bereits beschriebene samenspezifische Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986) verwendet. Aus dem Plasmid PCR-

40 Script/lePOCS wurde das 2,7 Kb Fragment des Legumin B4 Gen Promotors unter Verwendung der den Promotor 5' flankierenden EcoRI und der 3' flankierenden KpnI Schnittstellen isoliert. Das Plasmid pBinAR-TkTp-9/sll0418ASP wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI behandelt. Dies hatte zur Folge, daß

45 der 35S-Promotor des CaMV aus diesem Plasmid herausgetrennt wurde. Der Promotor des Legumin Gens wurde anschließend als EcoRI/KpnI Fragment in diesen Vektor kloniert, wodurch ein

Plasmid erzeugt wurde, welches die Expression des Deletionsklons des Gen *sll0418* unter die Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors stellte, siehe Abbildung 6. Fragment A (2700 bp) in Abbildung 6 beinhaltet den Promotor des Legumin B4 Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (245bp) Fragment kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* Transketolase, Fragment C (930Bp) ORF *sll0418*ΔSP aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 Fragment D (219Bp) für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

- 10 Dieses Plasmid (pBinARleP-TkTp-9/*sll0418*ΔSP) wurde zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen verwendet.

- Auch durch Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 7 in transgenen Pflanzen wurde eine Steigerung des Gehaltes an Tocopherol und Tocotrienol gemessen.

Beispiel 9

- 20 Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

- Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (EHA105) auf Grundlage einer modifizierten Vacuum Infiltrationsmethode transformiert (Steve Clough und Andrew Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16(6):735-43, 1998; Bechtold, N., Ellis, J. und Pelltier, G., in: Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Paris, 1993. 1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pBinARleP-TkTp-9/*sll0418* bzw. pBinAR-TkTp-9/*sll0418* (Abbildung 3 und 4) transformiert worden.

- 35 Samen der Primärtransformanten wurden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

- 40 Beispiel 10

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen

- Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Ma-

nual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA105. Zur Transformation wurden die Plasmide pBinARleP-TkTp-9/sll0418 bzw. pBinAR-TkTp-9/sll0418 verwendet. Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

20

Vom *Agrobacterium* Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16

Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B.

- 5 (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

#### Beispiel 11

10

#### Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen

Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM  $MgSO_4$ ) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation

- 20 eingesetzt.

- Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz durch die Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berührten. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte alle 7-10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten, wurden die Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (siehe oben) überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese ein und die gebildeten Sprossen konnten abgeschnitten werden. Die Kultivierung der Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte, konnte die Pflanzen in Pikiererde getopft werden.

#### Beispiel 12

45

#### Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Um zu bestätigen, daß durch die Expression der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC 6803* die Vitamin E Biosynthese in den transgenen Pflanzen gesteigert wird, wurden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den Konstrukten pBinARleP-TkTp-9/sll0418 bzw. pBinAR-TkTp-9/sll0418 Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*) analysiert. Dazu wurden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC 6803* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt. In allen Fällen war die Tocopherol- bzw. Tocotrienol-Konzentration in transgenen Pflanzen, die zusätzlich eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 exprimieren, im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöht.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 und mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz kodierend für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase aus *Synechocystis*.  
5
2. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase zur Herstellung von Pflanzen und photosynthetisch aktiven Organismen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen.  
10
3. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase zur Herstellung von Pflanzen und photosynthetisch aktiven Organismen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen.  
15
4. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und photosynthetisch aktiven Organismen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder eine mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz in Pflanzen und photosynthetisch aktiven Organismen exprimiert wird.  
20  
25
5. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor, eine Signalsequenz, eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 und einen Terminator oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.  
30  
35
6. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.  
40
7. Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5.  
45

Zeichn.

8. Pflanze nach Anspruch 7, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais, Roggen, Tagetes oder Sonnenblume.

5 9. Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder einer mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der 2-Methyl-6-phytylhydrochinon-methyltransferase.

10

10. Testsystem basierend auf der Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 7 oder einer mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 zur Identifizierung von Inhibitoren der 2-Methyl-6-phytylhydrochinonmethyltransferase.

15

20

25

30

35

40

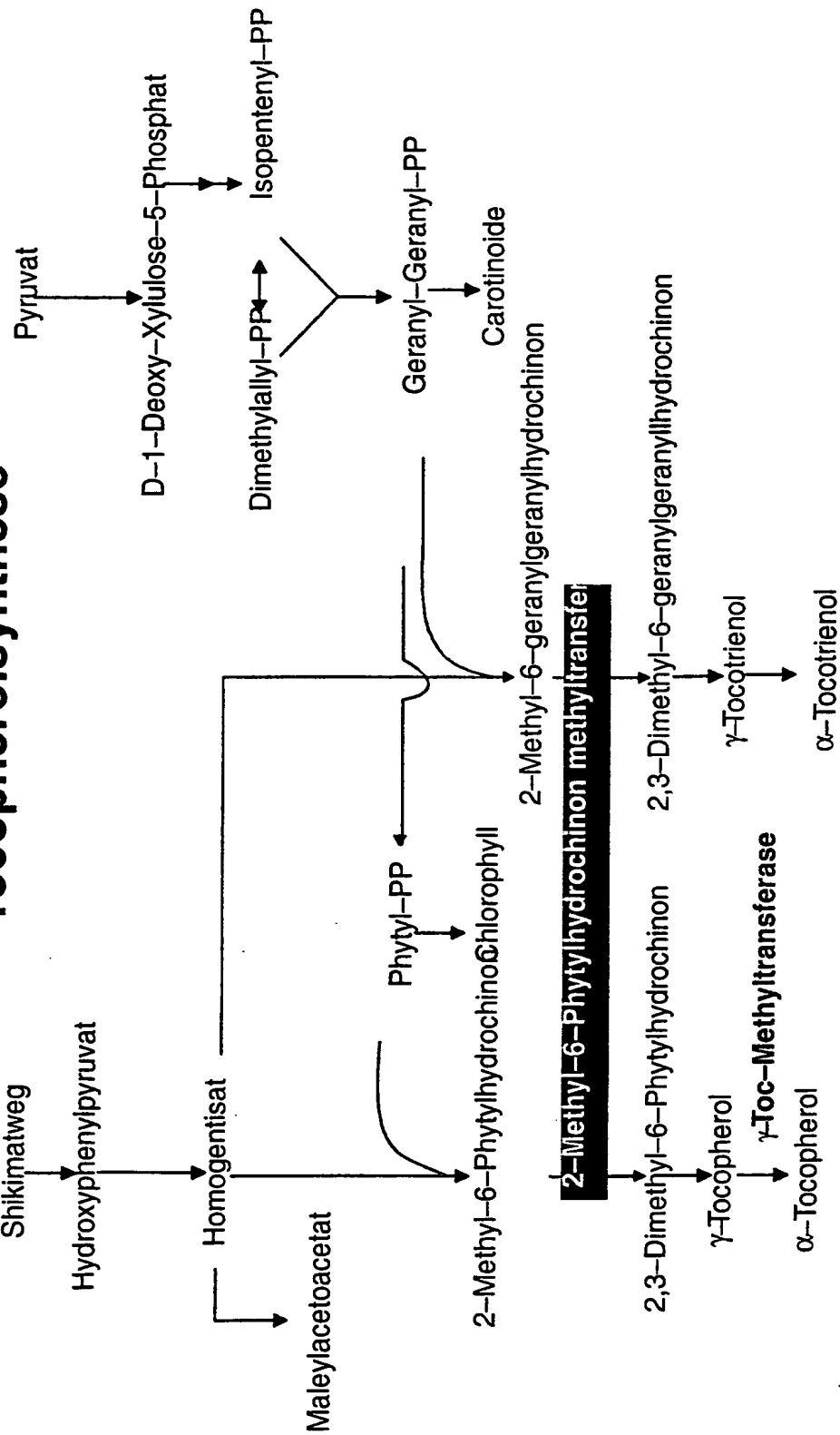
45





Abbildung 1

# Tocopherolsynthese









Q V K R A X E L A X A X X L X X T A X F Q V A D A L D L P F X D G S F D X V W S Majority  
170 180 190 200

128 Q V K R A T E L T P P - - D V T A K F A V D D A M A L S F P D G S F D V V W S sl10418.PRO  
129 Q V E R A G E R A R A L G L G S T C Q F Q V A N A L D L P F A S D S F D W V W S slr0089.PRO  
161 Q A K R A N D L A A A Q S L S H K A S F Q V A D A L D Q P F E D G K F D L V W S aratmt.PRO

X E S G E H M P D K A X F X K E L X R V X K P G G R L I X A T W C H R X X X X G Majority  
210 220 230 240

165 V E A G P H H P D K A V F A K E L L R V V K P G G I L V V A D W N Q R D D R Q V sl10418.PRO  
169 L E S G E H M P N K A Q F L Q E A W R V L K P G G R L I L A T W C H R P I D P G slr0089.PRO  
201 M E S G E H M P D K A K F V K E L V R V A A P G G R I I V T W C H R N L S A G aratmt.PRO

X X X L X X X E X X X L X X I X X X X X L P A X X S X X D Y X X X A X X X X X G Majority  
250 260 270 280

205 P L N F W E K P V M R Q L L D Q W S H P A F A S I E G F A E N L E A T G L V E G sl10418.PRO  
209 N G P L T A D E R R H L Q A I Y D V Y C L P Y V V S L P D Y E A I A R E C G F G slr0089.PRO  
241 E E A L Q P W E Q N I L D K I C K T F Y L P A W C S T D D Y V N L L Q S H S L Q aratmt.PRO

X I K T A D W S V X X V A P F W X X V I X X A X X X X X L W X L X X X G X K I X Majority  
290 300 310 320

245 Q V T T A D W T V P T L P A W L D T I I W Q G I I R P Q G W L Q Y G I R G F I K S sl10418.PRO  
249 E I K T A D W S V A V A P F W D R V I E S A F D P R V L W A L G Q A G P K I I N slr0089.PRO  
281 D I K C A D W S E N V A P F W P A V I R T A L T W K G L V S L L R S G M K S I K aratmt.PRO



	X A L X X X L M X X G Y X X - - G L X R F - - G X X T X X K P L X X - X - - -	Majority
	330 340 350 360	
285	V R E V P T I L L M R L A P G V G L C R F - - G M F K A V R K N A T Q A	sl10418.
289	A A L C L R L M K W G Y E R - - G L V R F - - G L L T G I K P L V - . 9 P Q S P	slr0089.
321	G A L T M P L M I E G Y K K - - G V I K F - - G I I T C Q K P L	aratmt.l

Majority

sl10418.  
slr0089.  
aratmt.l

318

324 R

348





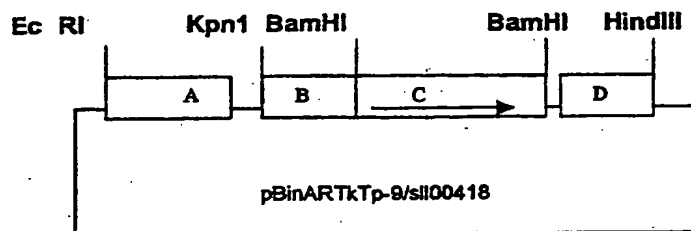


Abbildung 4

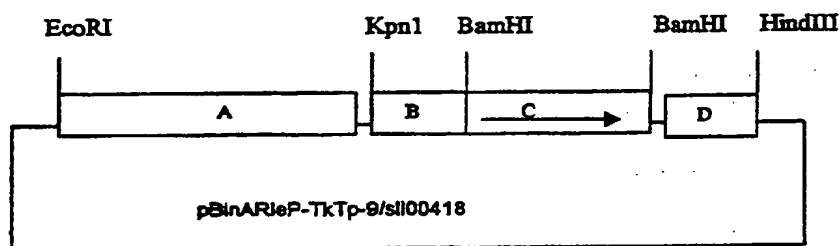


Abbildung 5

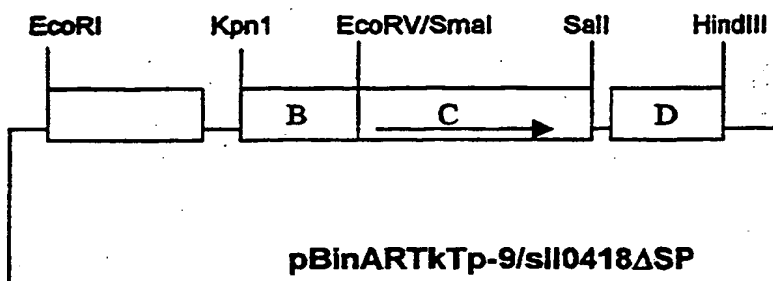
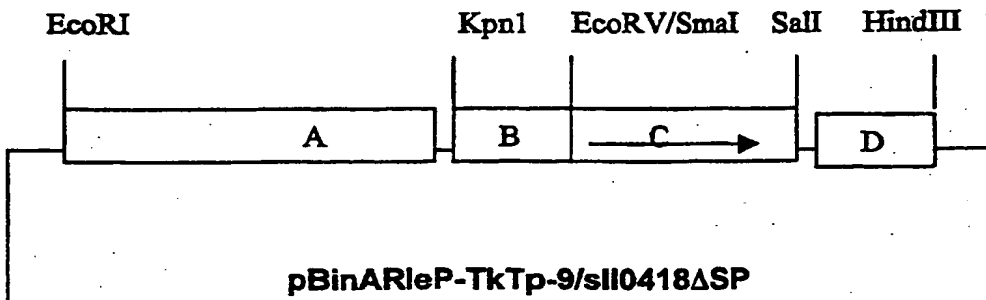


Abbildung 6





## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co.KGaA

<120> Ueberexpression einer DNA-Sequenz codierend fuer eine  
2-Methyl-phytylhydrochinon-methyltransferase in  
Pflanzen.

&lt;130&gt; MPMTSynechocystis

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 957

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(957)

&lt;400&gt; 1

atg ccc gag tat ttg ctt ctg ccc gct ggc cta att tcc ctc tcc ctg	48
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu	
1 5 10 15	
gcg atc gcc gct gga ctg tat ctc cta act gcc cgg ggc tat cag tca	96
Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser	
20 25 30	
tcg gat tcc gtg gcc aac gcc tac gac caa tgg aca gag gac ggc att	144
Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile	
35 40 45	
ttg gaa tat tac tgg ggc gac cat atc cac ctc ggc cat tat ggc gat	192
Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp	
50 55 60	
ccg cca gtg gcc aag gat ttc atc caa tcg aaa att gat ttt gtc cat	240
Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His	
65 70 75 80	
gcc atg gcc cag tgg ggc gga tta gat aca ctt ccc ccc ggc aca acg	288
Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr	



2

85										90					95					
gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att ctc gcc	336																			
Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala																				
100 105 110																				
aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc caa cag	384																			
Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln																				
115 120 125																				
gtg aaa cgg gcg acg gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc aag ttt	432																			
Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe																				
130 135 140																				
gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt ttc gac	480																			
Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp																				
145 150 155 160																				
gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa gct gtg	528																			
Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val																				
165 170 175																				
ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att ctg gtg	576																			
Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val																				
180 185 190																				
gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc aac ttc	624																			
Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe																				
195 200 205																				
tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc cac cct	672																			
Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro																				
210 215 220																				
gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc acg ggt	720																			
Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly																				
225 230 235 240																				
ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg acc ctc	768																			
Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu																				
245 250 255																				
ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc cgg ccc cag ggc	816																			
Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly																				
260 265 270																				
tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg cgg gaa gta	864																			
Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val																				
275 280 285																				



ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt tgt cgc 912  
 Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg  
 290 295 300

ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc act caa gct taa 957  
 Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 305 310 315

<210> 2

<211> 318

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 2

Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser  
 20 25 30

Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile  
 35 40 45

Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp  
 50 55 60

Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His  
 65 70 75 80

Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr  
 85 90 95

Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala  
 100 105 110

Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln  
 115 120 125

Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe  
 130 135 140

Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp  
 145 150 155 160

Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val  
 165 170 175





4

Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val  
 180 185 190

Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe  
 195 200 205

Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro  
 210 215 220

Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly  
 225 230 235 240

Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu  
 245 250 255

Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly  
 260 265 270

Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val  
 275 280 285

Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg  
 290 295 300

Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 305 310 315

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 974

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (7)..(963)

&lt;400&gt; 3

ggatcc atg ccc gag tat ttg ctt ctg ccc gct ggc cta att tcc ctc 48  
 Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu  
 1 5 10

tcc ctg gcg atc gcc gct gga ctg tat ctc cta act gcc cgg ggc tat 96  
 Ser Leu Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr  
 15 20 25 30

cag tca tcg gat tcc gtg gcc aac gcc tac gac caa tgg aca gag gac 144  
 Gln Ser Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp  
 35 40 45



ggc att ttg gaa tat tac tgg ggc gac cat atc cac ctc ggc cat tat	192
Gly Ile Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr	
50 55 60	
ggc gat ccg cca gtg gcc aag gat ttc atc caa tcg aaa att gat ttt	240
Gly Asp Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe	
65 70 75	
gtc cat gcc atg gcc cag tgg ggc gga tta gat aca ctt ccc ccc ggc	288
Val His Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly	
80 85 90	
aca acg gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att	336
Thr Thr Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile	
95 100 105 110	
ctc gcc aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc	384
Leu Ala Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro	
115 120 125	
caa cag gtg aaa cgg gcg acg gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc	432
Gln Gln Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala	
130 135 140	
aag ttt gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt	480
Lys Phe Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser	
145 150 155	
ttc gac gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa	528
Phe Asp Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys	
160 165 170	
gct gtg ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att	576
Ala Val Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile	
175 180 185 190	
ctg gtg gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc	624
Leu Val Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu	
195 200 205	
aac ttc tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc	672
Asn Phe Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser	
210 215 220	
cac cct gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc	720
His Pro Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala	
225 230 235	



6

acg ggt ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg 768  
 Thr Gly Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro  
 240 245 250

acc ctc ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc cgg ccc 816  
 Thr Leu Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro  
 255 260 265 270

cag ggc tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg cgg 864  
 Gln Gly Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg  
 275 280 285

gaa gta ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt 912  
 Glu Val Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu  
 290 295 300

tgt cgc ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc act caa gct 960  
 Cys Arg Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 305 310 315

taa attgcggatc c 974

<210> 4

<211> 318

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 4

Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser  
 20 25 30

Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile  
 35 40 45

Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp  
 50 55 60

Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His  
 65 70 75 80

Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr  
 85 90 95

Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala



7

100	105	110
Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln		
115	120	125
Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe		
130	135	140
Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp		
145	150	155
Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val		
	165	170
		175
Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val		
	180	185
		190
Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe		
	195	200
		205
Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro		
	210	215
		220
Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly		
225	230	235
		240
Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu		
	245	250
		255
Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly		
	260	265
		270
Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val		
	275	280
		285
Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg		
	290	295
		300
Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala		
305	310	315

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind









acg gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att ctc	291
Thr Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu	
80 85 90	
gcc aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc caa	339
Ala Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln	
95 100 105 110	
cag gtg aaa cgg gcg acg gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc aag	387
Gln Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys	
115 120 125	
ttt gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt ttc	435
Phe Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe	
130 135 140	
gac gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa gct	483
Asp Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala	
145 150 155	
gtg ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att ctg	531
Val Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu	
160 165 170	
gtg gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc aac	579
Val Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn	
175 180 185 190	
ttc tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc cac	627
Phe Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His	
195 200 205	
cct gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc acg	675
Pro Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr	
210 215 220	
ggt ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg acc	723
Gly Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr	
225 230 235	
ctc ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc cgg ccc cag	771
Leu Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln	
240 245 250	
ggc tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg cgg gaa	819
Gly Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu	
255 260 265 270	
gta ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt tgt	867



10

Val Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys  
 275 280 285

cgc ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc act caa gct taa 915  
 Arg Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 290 295 300

attctttaagg tcgac 930

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 301

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;400&gt; 8

Met Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser Ser  
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile Leu  
 20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp Pro  
 35 40 45

Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His Ala  
 50 55 60

Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr Val  
 65 70 75 80

Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala Lys  
 85 90 95

Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln Val  
 100 105 110

Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe Ala  
 115 120 125

Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp Val  
 130 135 140

Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val Phe  
 145 150 155 160

Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val Val  
 165 170 175



11

Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe Trp  
 180 185 190

Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro Ala  
 195 200 205

Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly Leu  
 210 215 220

Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu Pro  
 225 230 235 240

Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly Trp  
 245 250 255

Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val Pro  
 260 265 270

Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg Phe  
 275 280 285

Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala  
 290 295 300

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;400&gt; 9

gatatcacca tggccgctgg actgtatctc c

31

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;400&gt; 10

gtcgacctta agaatttaag cttgagtggc g

31





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/EP 00/05862

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/31 G01N33/53  
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 31 October 1996 (1996-10-31) KANEKO, T., ET AL. : "sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Syecchocystis sp. PCC6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of the potential protein-coding regions" XP002152668 accession no. D90914 ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2000

Date of mailing of the international search report

04/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr      1st Application No  
PCT/EP 00/05862

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOEFGEN R ET AL: "BIOCHEMICAL AND GENETIC ANALYSIS OF DIFFERENT PATATIN ISOFORMS EXPRESSED IN VARIOUS ORGANS OF POTATO SOLANUM-TUBEROSUM" PLANT SCIENCE (LIMERICK), vol. 66, no. 2, 1990, pages 221-230, XP000964790 ISSN: 0168-9452 cited in the application page 223, left-hand column</p> <p style="text-align: center;">---</p>	5,6
A	<p>WO 99 04622 A (UNIV NEVADA) 4 February 1999 (1999-02-04) cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,X	<p>WO 00 10380 A (UNIV NEVADA) 2 March 2000 (2000-03-02) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
P,X	<p>WO 00 32757 A (RAFALSKI J ANTONI ;DU PONT (US); COUGHLAN SEAN J (US); MIAO GUO HU) 8 June 2000 (2000-06-08) the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	9,10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9904622 A	04-02-1999	AU 8506198 A EP 1009812 A	16-02-1999 21-06-2000
WO 0010380 A	02-03-2000	AU 5786199 A	14-03-2000
WO 0032757 A	08-06-2000	AU 2037700 A	19-06-2000



# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05862

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/31 G01N33/53  
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 31. Oktober 1996 (1996-10-31) KANEKO, T., ET AL. : "sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Syecchocystis sp. PCC6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of the potential protein-coding regions" XP002152668 accession no. D90914 ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOEFGEN R ET AL: "BIOCHEMICAL AND GENETIC ANALYSIS OF DIFFERENT PATATIN ISOFORMS EXPRESSED IN VARIOUS ORGANS OF POTATO SOLANUM-TUBEROSUM" PLANT SCIENCE (LIMERICK), Bd. 66, Nr. 2, 1990, Seiten 221-230, XP000964790 ISSN: 0168-9452 in der Anmeldung erwähnt Seite 223, linke Spalte ----	5,6
A	WO 99 04622 A (UNIV NEVADA) 4. Februar 1999 (1999-02-04) in der Anmeldung erwähnt ----	
P,X	WO 00 10380 A (UNIV NEVADA) 2. März 2000 (2000-03-02) das ganze Dokument ----	1-8
P,X	WO 00 32757 A (RAFALSKI J ANTONI ;DU PONT (US); COUGHLAN SEAN J (US); MIAO GUO HU) 8. Juni 2000 (2000-06-08) das ganze Dokument -----	9,10

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/05862

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9904622	A	04-02-1999	AU	8506198 A	16-02-1999
			EP	1009812 A	21-06-2000
WO 0010380	A	02-03-2000	AU	5786199 A	14-03-2000
WO 0032757	A	08-06-2000	AU	2037700 A	19-06-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**